

HPLC-FLD 同时测定全血中加替沙星和莫西沙星含量

陈晓红 (宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010)

摘要: 目的 建立一种灵敏、可靠的全血中加替沙星和莫西沙星的高效液相色谱荧光检测方法。方法 样品经磷酸盐缓冲液提取后,用 Waters Oasis[®] MAX 小柱进行净化,甲醇-乙腈-0.2%甲酸(15:15:70)为流动相,采用 Cloversil - C₁₈ 柱(3.0 mm ×150 mm, 5 μm)分离,荧光检测波长:λ_{ex} 288 nm 和 λ_{em} 493 nm,内标法定量。结果 加替沙星和莫西沙星在 15.0~240.0 μg·L⁻¹ 内呈良好线性,方法回收率在 97.7%~101.3% 之间,日内 RSD<6.0%,其定量限为 15.0 μg·L⁻¹。结论 本方法简便、灵敏、干扰少,特异性好,能满足血液上加替沙星和莫西沙星的检测要求。

关键词: 高效液相色谱-荧光法; 全血; 加替沙星; 莫西沙星

中图分类号: R917.101; R917.795

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0412-03

Determination of Gatifloxacin and Moxifloxacin in Whole Blood by HPLC Coupled with Fluorescence Detection

CHEN Xiaohong (Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop a sensitive and accurate method for the determination of gatifloxacin and moxifloxacin in whole blood by high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection(HPLC-FLD). **METHODS** After gatifloxacin and moxifloxacin in whole blood were extracted by phosphate buffer, the sample was cleaned with solid-phase extraction (SPE) using Oasis[®] MAX cartridges. The separation was performed on Cloversil - C₁₈ column (3.0 mm ×150 mm, 5 μm) using the mobile phase consisting of methanol-acetonitrile-0.2% formic acid(15:15:70). Detection was carried out on a fluorescence detection at λ_{ex} 288 nm and λ_{em} 493 nm. **RESULTS** Calibration curves were linear within the range of 15.0~240.0 μg·L⁻¹, and the extraction recoveries were from 97.7% to 101.3%, the RSDs were less than 6.0%. The limits of quantification were found to be 15.0 μg·L⁻¹. **CONCLUSION** This method is found to be simple, sensitive, little interferential and good specificity for the determination of gatifloxacin and moxifloxacin in whole blood.

KEY WORDS: HPLC-FLD; whole blood; gatifloxacin; moxifloxacin

加替沙星和莫西沙星是具有广谱抗菌活性的新颖8-甲氧基氟喹诺酮类抗生素,用于治疗革兰阳性菌、革兰阴性菌、支原体等病原体引起的感染,具有良好的药动学和广谱抗菌能力,目前已广泛应用于临床。高效液相色谱法是生物体液中药物残留测定的较好方法^[1-6]。目前,血液中加替沙星和莫西沙星的检测方法也主要是液相色谱法包括采用紫外^[7-10],荧光^[11]和质谱^[12-13]等进行检测,但文献报道的方法仅对单一物质进行检测,缺少二者同时测定的系统研究,而且紫外检测法存在选择性差,干扰大、灵敏度低等缺点,而质谱法则仪器昂贵,难以普及。荧光检测与紫外检测相比,具有基体干扰少、灵敏度高和选择性好等优点,本实验利用固相萃取技术进行样品的净化,采用内标法定量,高效液相色谱荧光法测定,用于血液上加替沙星和莫西沙星浓度的同时测定,取得了良好的效果,为加替沙星和莫西沙星的临床药动学和生物利用度研

究以及临床患者的血药浓度同时快速测定提供方法学基础。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括四元泵、在线真空脱气机、荧光检测器、柱温箱和自动进样器(美国 Agilent公司);全玻璃溶剂过滤器(美国 Waters公司);HGC-24 型氮吹仪(天津恒奥科技有限公司);Vortex-Genie 2型多功能旋涡混合器(美国 Scientific Industries公司);12孔固相萃取仪(美国 Supelco公司);Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯(德国 Merck 公司),氨水、氢氧化钠、磷酸二氢钾均为分析纯,所有的溶剂使用前均用 0.45 μm 滤膜过滤;实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统。Waters Oasis[®] MAX 6 mL/150 mg 固相萃取小柱(美国 Waters 公司);环

丙沙星对照品(纯度99%,批号:51107,加拿大多伦多化学研究所);加替沙星对照品(纯度98%,批号:G250000,加拿大多伦多化学研究所);莫西沙星对照品(纯度100%,批号:M745000,加拿大多伦多化学研究所);

标准贮备液($0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$):分别准确称取环丙沙星、加替沙星和莫西沙星对照品 1.0 mg 分别置 10 mL 量瓶中,用少量甲醇溶解后,并用甲醇定容至刻度。

环丙沙星中间使用液($2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$):准确吸取 2.0 mL 标准贮备液($0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)于 100 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏保存。

混合加替沙星和莫西沙星标准工作溶液的配制:临用时吸取一定量的加替沙星和莫西沙星标准贮备液,用甲醇逐级稀释,配制成适当浓度的混合标准系列。

磷酸盐缓冲液:称取磷酸二氢钾 6.8 g ,加水溶解定容至 500 mL ,用 $20\%\text{ NaOH}$ 溶液调 pH 为 7.0 。

$5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}$:称取 $\text{NaOH } 20\text{ g}$,加水溶解定容至 100 mL 。

1.2 色谱条件

色谱柱:Cloversil C18柱($3.0\text{ mm}\times 150\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$);流速: $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相:甲醇-乙腈- $0.2\%\text{ 甲酸}(15:15:70)$;荧光检测波长: $\lambda_{\text{ex}} 288\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 493\text{ nm}$ 。

1.3 分析步骤

吸取全血样品 1.0 mL 加到 5.0 mL 离心管中,加入环丙沙星中间使用液 $15\text{ }\mu\text{L}$ (浓度为 $30.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),漩涡混匀,加入磷酸盐缓冲液 4.0 mL 进行提取,充分振摇,混匀 10 min ,过已用甲醇 3 mL , $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH } 3\text{ mL}$ 和水 3 mL 活化、平衡固相萃取小柱,将上清液全部转入固相萃取小柱后,分别用水 3 mL , $5\%\text{ 氨水 } 3\text{ mL}$,甲醇 3 mL 淋洗,最后,用 $4\%\text{ 甲酸甲醇溶液 } 4\text{ mL}$ 洗脱,氮吹,挥干溶剂,用甲醇定容至 1.0 mL ,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜后,取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪。

2 结果与讨论

2.1 荧光激发、发射波长的选择

实验在 $230\sim 380\text{ nm}$ 以及 $350\sim 600\text{ nm}$ 之间分别对环丙沙星、加替沙星和莫西沙星的激发波长和发射波长进行全扫描,结果环丙沙星、加替沙星和莫西沙星的最大激发波长分别为 275 nm 、 288 nm 和 288 nm ,最大发射波长分别为 445 nm 、 478 nm

和 493 nm 。实验结果显示,相同浓度的环丙沙星、加替沙星和莫西沙星其荧光响应强度从强到弱依次为环丙沙星、加替沙星、莫西沙星。为此,本实验以莫西沙星的最大激发波长和最大发射波长为实验波长。

2.2 样品预处理方法的选择

血液中抗生素浓度的测定很多文献报道都采用液-液萃取法^[9-11],但由于血液本底复杂,被测化合物的含量低。为此,本试验采用固相萃取作为前处理方法对样品进行净化。实验比较了具有反相机制的HLB和同时具有离子交换和反相双重机制的MAX两种固相萃取柱对实验结果的影响。结果证明,两种小柱对样品的净化能力相当,而MAX小柱对目标化合物的提取率高于HLB小柱,所以,本实验选用了MAX小柱。同时,实验又比较 $6\text{ mL}/150\text{ mg}$ 和 $3\text{ mL}/60\text{ mg}$ 两种规格的小柱,结果发现,使用 $3\text{ mL}/60\text{ mg}$ 小柱时,无论淋洗或洗脱都比较困难,原因是血液中含有大量的有机物,而且样品黏度较大,所以实验采用 $6\text{ mL}/150\text{ mg}$ 小柱,既方便操作,又提高了提取回收率。

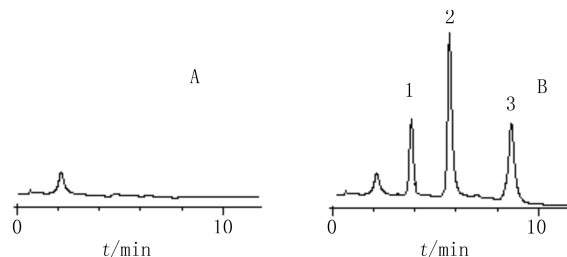


图1 典型的空白血样(A)及空白加标(B)(均为 $30.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)色谱图

1-环丙沙星; 2-加替沙星; 3-莫西沙星

Fig 1 Typical chromatogram of blank sample (A) and spiked blank sample (B) ($30.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

1-ciprofloxacin; 2-gatifloxacin; 3-moxifloxacin

2.3 内标物的选择

内标方法是痕量定量分析中的首选方法。作为内标物必须与待测物质具有相似的物理性质与化学性质,与被测化合物具有合理的分离度,而且确保样品中不存在该化合物,以此来校正样品处理过程中对目标化合物造成的损失,提高测定的方法回收率。本实验选择使用了与目标化合物同属氟喹诺酮的环丙沙星作为内标。

2.4 专属性试验

典型的空白血样、加标血样的荧光色谱图见图1。从图中可见,环丙沙星、加替沙星和莫西沙星的典型色谱图保留时间分别为 3.950 、 5.649 和 8.598 min ,全血中内源性杂质对样品的测定无干扰,峰

形和分离度均比较理想。

2.5 线性范围和灵敏度

吸取6份空白样品各1.0 mL 加到6管5.0 mL离心管中，分别加入环丙沙星中间使用液15 μL （浓度为30.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ），漩涡混匀，加入一定量的混合加替沙星和莫西沙星标准工作溶液，配制成浓度分别为0.0、15.0、30.0、60.0、120.0、240.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准系列，在上述实验条件下，以加替沙星和莫西沙星的浓度为横坐标，加替沙星和莫西沙星与内标峰面积之比为纵坐标，分别绘制校准曲线。其线性方程为： $Y=0.051X-0.0038$ ， $r=0.9993$ （加替沙星）； $Y=0.036X-0.0031$ ， $r=0.9991$ （莫西沙星），结果显示，加替沙星和莫西沙星在15.0~240.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内均呈现良好的线性。按 $S/N>10$ 计算，其定量检出限均为15.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6 方法回收率和精密度

分别在12份1.0 mL空白血样中加入环丙沙星中间使用液15 μL （浓度为30.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ），混匀，再加入一定量的加替沙星和莫西沙星标准储备液，使其浓度分别为15.0、60.0、240.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 各4份，按“1.3”项下方法处理，进样分析，考察日内精密度的（1 d内每份样品测定5次）以及方法回收率。结果见表1，日内精密度 $RSD<6.0\%$ ，方法回收率在97.7%~101.3%之间。

表1 回收率与精密度测定结果($n=5$)

Tab 1 The result of recovery and precision ($n=5$)

化合物	加入量 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	测定值 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 /%	精密度 /%
加替沙星	15.0	15.2 $\pm$ 0.9	101.3	5.92
	60.0	58.9 $\pm$ 2.8	98.2	4.75
	240.0	234.9 $\pm$ 9.7	97.9	4.13
莫西沙星	15.0	14.8 $\pm$ 0.8	98.7	5.40
	60.0	58.6 $\pm$ 1.3	97.7	2.22
	240.0	236.1 $\pm$ 7.7	98.4	3.26

2.7 样品分析

取同时口服加替沙星和莫西沙星200 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 的患者全血3份（晨服各200 mg 加替沙星和莫西沙星片，在给药后1 h抽取静脉血1.0 mL，分别为样品A、B和C），然后按上述方法进行处理和测定，结果见表2。

表2 样品分析结果($n=5$)

Tab 2 The result of the real world samples ($n=5$)

样品名称	化合物	
	加替沙星 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	莫西沙星 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
A	0.25	0.18
B	0.29	0.16
C	0.17	0.27

3 结论

利用固相萃取技术，高效液相色谱荧光法检测，建立的血液中莫西沙星和加替沙星浓度的测定方法具有简便、灵敏、准确的优点，完全能满足血液样品中药物残留检测的要求。

REFERENCES

[1] JIN M C, CHEN X H, LI X P. Determination of five 4-hydroxycoumarin rodenticides in whole blood by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2007, 25(2): 214-216.

[2] JIN M C, MA J M, WANG L. Determination of racumin in urine by high-performance liquid chromatography [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis (中华劳动卫生职业病杂志), 2006, 24(11): 682-683.

[3] JIN M C, MA J M, GONG W J. Determination of warfarin in urine by high-performance liquid chromatography [J]. Chin J Public Health (中国公共卫生), 2006, 22(7): 887.

[4] JIN M C, LI X P, YAO X P. Determination of warfarin and coumatetralyl in whole blood by high-performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Tech (中国卫生检验杂志), 2005, 15(9): 1050-1051; 1059.

[5] JIN M C, MA J M, LI X P. Characterization of coumatetralyl in whole blood by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Tech (中国卫生检验杂志), 2005, 15(6): 656-658.

[6] JIN M C, OUYANG X K, CHEN X H. High-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of flocoumafen and brodifacoum flocoumafen and brodifacoum in whole blood [J]. J Appl Toxicol, 2007, 27(1): 18-24.

[7] HOLTZAPPLE C K, BUCKLEY S A, STANKER L H. Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity reversed-phase liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2001, 754(1): 1-9.

[8] ZHANG C L, NIGHTINGALE C H, NICOLAU D P. A reversed-phase high performance liquid chromatographic assay for determination of moxifloxacin in special growth media [J]. Chin Pharm J (中国药物杂志), 2004, 39(9): 699-701.

[9] FAN L H, LI X G. Determination of gatifloxacin in the blood by high-performance liquid chromatography [J]. Lishizhen Med Mat Med Res (时珍国医国药), 2007, 18(2): 408.

[10] ZHANG Y, CHEN Y N, CHEN W F. Determination of moxifloxacin in serum by solid phase extraction HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2007, 27(4): 481-483.

[11] HUNG Q C, TU W S. Analysis of gatifloxacin injection by HPLC with fluorescence detection [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2003, 20(1): 42-43.

[12] TOUSSAINT B, CHEDIN M, BORDIN G, RODRIGUEZ A R. Determination of (fluoro) quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry I. Laboratory-validated method [J]. J Chromatogr A, 2005, 1088(1): 32-39.

[13] VISHWANATHAN K, BARTLETT M G, STEWART J T. Determination of moxifloxacin in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 30(4): 961-968.

收稿日期: 2008-05-23